

6

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 728 467

②1 N° d'enregistrement national :

94 15680

⑤1 Int Cl^e : A 61 K 38/00, 35/80

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 21.12.94.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 28.06.96 Bulletin 96/26.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : CODIF INTERNATIONAL SA — FR.

⑦2 Inventeur(s) : GEDOUIN JEAN et VALLEE
ROMUALD.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : CABINET LE GUEN ET MAILLET.

⑤4 **PRODUIT COSMETIQUE A BASE D'EXTRAITS PROTEIQUES NATURELS D'ALGUES.**

⑤7 La présente invention concerne un produit cosmétique
à base d'extraits protéiques naturels d'algues microscopi-
ques du type *Chlorella* laquelle possède la particularité
d'être monocellulaire.

FR 2 728 467 - A1



La présente invention concerne un produit cosmétique à base d'extraits protéiques naturels d'algues.

A titre d'information, on a déjà mentionné l'usage d'extraits d'algues dans des produits à activités lipolytiques. On pourra
5 consulter à ce sujet les documents suivants: EP-A-438 302, FR-A-2 581 876 et la demande de brevet français 94 00686 déposée le 18/01/94 par la présente demanderesse.

Toutefois, on n'a pas jusqu'ici mis en évidence les effets améliorateurs d'extraits d'algues sur le derme de la peau et ses
10 composants.

Un objet de l'invention consiste à prévoir un produit cosmétique de ce type qui présente ces avantages.

Suivant la présente invention, il est prévu un produit cosmétique à base d'extraits protéiques naturels d'algues
15 microscopiques du type *Chlorella* laquelle possède la particularité d'être monocellulaire.

Suivant une autre caractéristique, l'extrait protéique est l'extrait de protéines totales.

Suivant une autre caractéristique, l'extrait protéique est
20 l'extrait de protéines précipitées.

Suivant une autre caractéristique, l'extrait protéique est l'extrait de protéines surnageant.

L'invention concerne également une composition cosmétique qui est caractérisée en ce qu'elle contient un produit cosmétique
25 précédemment décrit.

L'invention concerne également des utilisations des produits cosmétiques décrits précédemment ou de la composition précédente respectivement pour l'amélioration de la matrice extracellulaire du derme, pour leurs propriétés antiélastasiques, pour leurs propriétés
30 anticollagénases et pour la stimulation de la néosynthèse des collagènes.

Afin de mettre en évidence ces effets et propriétés sur le derme d'un tel produit, on a préparé, comme on va le voir, trois types d'extraits protéiques de l'algue: (1) l'extrait de protéines totales
35 appelé par la suite extrait CT, l'extrait de protéines précipitées

appelé par la suite extrait EP et l'extrait de protéines surnageant appelé par la suite ES.

On décrira ensuite quatre effets différents sur le derme, c'est à dire plus particulièrement sur la matrice extracellulaire du derme
5 qui constitue le milieu environnant des cellules dermiques, qui est, comme on le sait, synthétisée par les fibroblastes lesquelles sont les cellules majeures du derme, et qui est composée principalement de protéines, telles que collagène, élastine, fibronectine, etc., et de glycosaminoglycanes.

10 En ce qui concerne la préparation de l'extrait protéique de *chlorella* CT, on se reportera à la Fig.1 du dessin et, en ce qui concerne les préparations des extraits protéiques de *chlorella* ES et EP, on se reportera à la Fig. 2. Les informations données dans ces figures font partie de la description.

15 Le dosage de l'azote total a permis de déterminer la concentration en protéines de chacun des extraits. L'extrait sec a été obtenu par passage à l'étuve à 105°C et les cendres ont été déterminées après un passage au four à moufle.

20 Le dosage des minéraux a été réalisé par spectrophotométrie. Les trois extraits CT, EP et ES ont été lyophilisés.

Le résultat des analyses est donné dans le Tableau 1 suivant.

Tableau 1

EXTRAIT	EP	ES	CT
Ext sec %	94,77	94,46	97,31
Cendres %	13,19	24,92	17,74
Protéine %	67,5	51,87	52,23
Mg g/kg	0,598	0,626	0,92
Ca g/kg	1,019	1,15	2,2
Fe mg/kg	307,56	426,58	204,54
Cu mg/kg	106,57	110,36	31,43
Mn mg/kg	21,72	37,7	30,3
Zn mg/kg	180,99	1310,78	275,86
Cl %	3,92	3,09	2,18
P g/kg		0,486	

La composition en acides aminés dans les extraits EP, ES et CT est donnée dans le Tableau 2 suivant, en ce qui concerne les acides aminés totaux.

Tableau 2

	EP	ES	CT
Acides aminés totaux	%	%	%
Lysine	6,07	7,59	5,53
Histidine	abs	Abs	5,63
Arginine	5,85	5,99	13,18
Acide aspartique	11,97	10,54	5,21
Thréonine	5,88	5,34	4,97
Sérine	4,68	5,71	15,68
Acide glutamique	16,39	15,13	6,29
Proline	4,45	5,53	6,83
Glycine	6,27	11,24	9,93
Alanine	9,55	11,24	1,23
Cystéine	0,47	1,87	6,17
Valine	6,31	4,68	2,63
Méthionine	0,61	1,83	3,10
Isoleucine	3,69	1,97	7,67
Leucine	8,41	4,12	1,45
Tyrosine	3,64	2,20	4,47
Phénylalanine	0,05	0,01	
Tryptophane	non dosé	non dosé	non dosé

En ce qui concerne les acides aminés libres, l'extrait EP présente 0,02 % d'acides aminés libres, l'extrait CT présente 0,11 % et l'extrait ES présente 0,14 %.

On va maintenant étudier, à titre indicatif, quatre effets des actifs cosmétiques ES, EP et CT et en donner les résultats expérimentaux.

I - Effet sur le dépôt de la matrice extracellulaire par des fibroblastes en culture.

La matrice extracellulaire, constituée principalement de collagène et d'élastine, représente l'élément de soutien majeur du derme. Elle est synthétisée et modelée par les fibroblastes. La quantité ainsi que le degré d'organisation et d'interaction de ses éléments constitutifs sont des paramètres importants de l'élasticité et de la fermeté cutanées.

Les extraits EP, ES et CT ont été incubés en présence de fibroblastes à confluence pendant 48 h. Des cultures témoins, sans produit à l'essai, ont été réalisées en parallèle. Au cours de l'incubation, les cellules ont été observées avec un microscope optique à contraste de phase.

Ensuite, les fibroblastes ont été décollés du support de culture par congélation/décongélation. On a ensuite fixé la matrice extracellulaire avec du glutaraldéhyde (2,5 % P/V) dans un tampon de cacodylate de sodium (0.1 M, pH 7,4), on l'a déshydratée dans des bains successifs d'éthanol, puis séchée sous CO₂, puis métallisée avec un mélange d'or et de palladium. Les préparations ont été observées au microscope à balayage et photographiées.

L'extrait EP n'a pas montré d'action favorable sur la matrice déposée. Cependant il faut émettre une réserve sur ce résultat dans la mesure où, dans ce modèle, il n'y a pas de barrière cutanée. Mais tout laisse à croire que l'extrait EP pourrait avoir une action favorable.

L'extrait CT à 40 µg/ml modifie peu la densité des fibres déposées par rapport au témoin; en revanche, le diamètre de ces fibres est augmenté.

A 200 $\mu\text{g/ml}$, il augmente fortement la densité de la matrice déposée et le nombre d'agrégats déposés le long des fibres est augmenté.

L'extrait ES à 800 et 4000 $\mu\text{g/ml}$ modifie de façon importante l'aspect de la matrice: la quantité de protéines déposées est augmentée, le diamètre des fibres est plus important et de nombreux agrégats sont présents le long des fibres.

Le Tableau 3 ci-dessous donne le récapitulatif des effets.

Tableau 3

10

Composé	Concentration $\mu\text{g/ml}$	Caractéristiques de la matrice déposée (par rapport aux cultures témoins)			
		Quantité de matrice	Longueur des fibres	Diamètre des fibres	Aspect de la matrice
EP	8	0/-	0/-	+	0
	40	0	0	0	0
	200	0/-	0/-	0	fin
CT	8	0	0	0	0
	40	0/+	0	+	0
	200	+	0	0	structuré
ES	160	0	0	0	0
	800	+	+	0/-	structuré
	4000	+	+	+	structuré

0 : pas de différence observée par rapport aux témoins
 - : diminution par rapport aux témoins
 + : augmentation par rapport aux témoins

En résumé, les fibroblastes cultivés *in vitro* déposent sur le support de culture les éléments majeurs de cette matrice, notamment les protéines. Ce dépôt peut être observé en microscopie électronique à balayage. Les composés CT et ES augmentent la densité du réseau de fibres déposées par les fibroblastes. Ces extraits peuvent donc permettre d'améliorer la qualité de la matrice déposée. Cette activité pourrait contribuer à la "restructuration" des tissus cicatriciels ou vieillissants.

20

II - Mise en évidence des propriétés antiélastasiques des extraits EP, ES et CT.

Le réseau d'élastine a pour fonction d'assurer la cohésion et l'élasticité du tissu. Une destruction graduelle du tissu élastique se produit sous l'action des élastases qui sont des enzymes. Il est donc préférable d'en limiter l'action.

5 L'extrait EP, ES ou CT est mis en contact direct avec une élastase en présence d'un substrat, le N-succinyl-(1-analine)3-p-nitroanilide, dit S.A.N.A. L'élastase entraîne la rupture protéolytique de la liaison amidique entre l'analine et le paranitroanilide du substrat et libère un chromophore. L'activité de
10 l'élastase est déterminée par la vitesse d'apparition du chromophore et est mesurée pendant 20 minutes à 410 nm par spectrophotométrie.

Afin d'évaluer les propriétés des trois extraits EP, ES, CT les mesures suivantes sont effectuées. L'activité de l'élastase est mesurée sans actif et correspond à 100 % d'activité élastasique.
15 C'est le témoin. L'activité de l'élastase est mesurée en présence de l'actif supposé inhibiteur. C'est l'essai.

Le Tableau 4 ci-dessous donne les résultats en pourcentages d'inhibition de l'élastase en fonction de la concentration finale de l'extrait.

Tableau 4

% Extrait EP	0,03	0,045	0,06	0,075
% inhibition	18,1	30	45,5	54,4

%Extrait ES	0,15	0,25	0,35	0,5
% inhibition	7,2	21	25,6	42,1

% Extrait CT	0,03	0,06	0,084
% inhibition	9,8	21,1	30,8

III - Inhibition de la protéolyse *in vitro*: protection du collagène vis-à-vis de la collagénase.

La présence de collagénases spécifiques dans la peau humaine ne fait plus de doute. L'inhibition de la collagénase est mise en évidence par un test de diffusion en gel d'agarose. Dans ce test, le substrat, c'est-à-dire le collagène, est incorporé dans un gel d'agarose et exposé à l'action de son enzyme catabolique, c'est-à-dire la collagénase, au sein du gel. La dégradation du substrat par l'enzyme sert de base de comparaison pour l'évaluation du test où le substrat est incubé au préalable avec un des trois extraits EP, ES ou CT à 0,15 %.

Les résultats sont les suivants: avec l'extrait EP, la protection est de 54,9 %; avec l'extrait ES, elle est de 41,4 %; et, avec l'extrait CT, elle est de 45,4 %.

Les extraits EP, ES et CT présentent un effet protecteur du collagène. Ces résultats ont été confirmés par une étude réalisée sur coupe du derme. En protégeant les fibres de collagène du derme, ces extraits permettent de préserver l'intégralité des propriétés biomécaniques des tissus cutanés et de prévenir leur relâchement.

IV - Stimulation de la néosynthèse des collagènes

a) Dans des cultures de fibroblastes de dermes humains

Ce modèle *in vitro*, reposant sur l'utilisation de fibroblastes de derme humain en culture, a été retenu pour l'étude des effets des actifs ES et CT (EP présente une toxicité révélée au rouge neutre et trop importante pour être étudiée par ce modèle).

Les cultures de fibroblastes ont été incubées pendant 48 h avec les actifs à l'essai. La proline tritiée, acide aminé précurseur des collagènes, a été ajoutée au milieu de culture pendant les 24 dernières heures de l'incubation.

Les protéines synthétisées par les cellules ont été précipitées par l'acide trichloracétique. Les précipités, après lavage pour éliminer le précurseur non incorporé, ont été extraits par l'acide acétique. On mesure l'incorporation de proline tritiée dans les protéines acido-solubles correspondant principalement aux collagènes en scintillation liquide.

Le Tableau 5 ci-dessous donne les résultats de l'incorporation de proline tritiée dans les protéines néosynthétisées par les fibroblastes en culture incubés en présence de l'extrait ES ou CT.

Tableau 5

Concentration de ES en µg/ml	0	160	800	4000
% proline incorporée dans les protéines acido-solubles par rapport aux cultures témoin	100	113	182	94

Concentration de CT en µg/ml	0	8	40	200
% de proline incorporée dans les protéines acidosolubles par rapport aux cultures témoin	100	132	83	71

Ainsi, les composés ES à 0,8 mg/ml et CT à 8 µg/ml stimulent la
5 synthèse des collagènes.

b) Dans un modèle tridimensionnel

Un modèle de peau reconstituée, tel que celui qui est fabriqué
par la société ATS sous le nom SKIN² et qui est proche du modèle
vivant puisqu'il s'agit de fibroblastes dermiques humains mis en
10 culture sur un nylon recouvert par des cellules épidermiques, a
permis de confirmer que les composés ES et CT présentent des effets
stimulants sur la synthèse des protéines acido-solubles. Il a
également permis de montrer que les extraits EP et CT n'étaient pas
toxiques *in vivo*.

15 Le Tableau 6 ci-dessous donne les résultats des pourcentages de
la synthèse des collagènes.

Tableau 6

	Concentration (% P/V)			
	0	0,04	0,2	1
ES	100	226	280	162
EP	100	251	227	82
CT	100	247	227	97

Les propriétés mécaniques de la peau sont en grande partie dues aux collagènes qui constituent la trame principale de la matrice du derme.

5 Dans cette étude, les composés EP, ES et CT ont montré des effets stimulants sur la synthèse des protéines acido-solubles. Ces observations permettent de revendiquer une activité "raffermissante" du derme cutané ou "restructurante".

REVENDEICATIONS

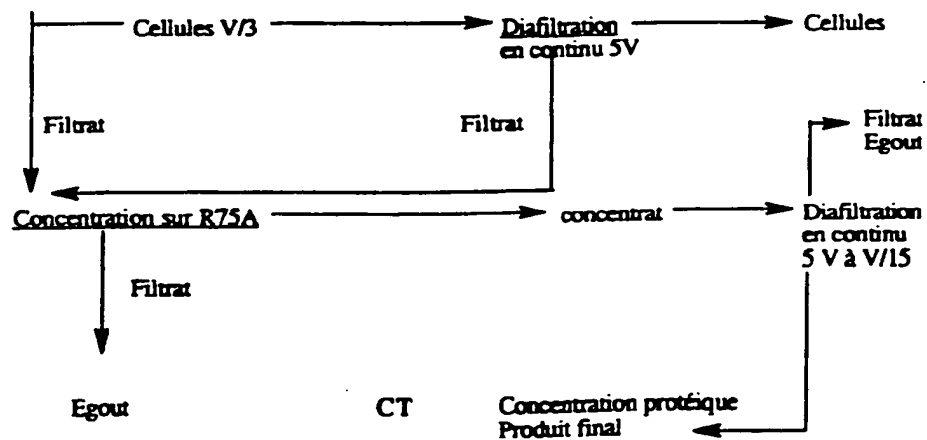
- 1) Produit cosmétique à base d'extraits protéiques naturels d'algues, caractérisé en ce qu'il est constitué d'extraits protéiques naturels d'algues microscopiques du type *chlorella* laquelle possède la particularité d'être monocellulaire.
- 5 2) Produit cosmétique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que l'extrait protéique est l'extrait de protéines totales.
- 3) Produit cosmétique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que l'extrait protéique est l'extrait de protéines précipitées.
- 10 4) Produit cosmétique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que l'extrait protéique est l'extrait de protéines surnageant.
- 5) Composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle contient un produit selon une des revendications 1 à 4.
- 6) Utilisation d'un produit cosmétique suivant l'une des
15 revendications 1 à 4 ou d'une composition selon la revendication 5 pour l'amélioration de la matrice extracellulaire du derme.
- 7) Utilisation d'un produit cosmétique suivant l'une des revendications 1 à 4 ou d'une composition selon la revendication 5 pour leurs propriétés antiélastasiques.
- 20 8) Utilisation d'un produit cosmétique suivant l'une des revendications 1 à 4 ou d'une composition selon la revendication 5 pour leurs propriétés anticollagénases.
- 9) Utilisation d'un produit cosmétique suivant l'une des revendications 1 à 4 ou d'une composition selon la revendication 5
25 pour la stimulation de la néosynthèse des collagènes.

EXTRAIT PROTEIQUE DE CHLORELLA CT**Extraction**

Eau déminéralisée stérile
Soude 1N
Chlorella à 3 %
Broyage 2 H (Par ex. à 10 000 t / mn ($v_{\text{lim}} = 20,9$ m/s) avec rotor-stator à cage)

Audification

HCl 37 %
QSP pH = 9,0

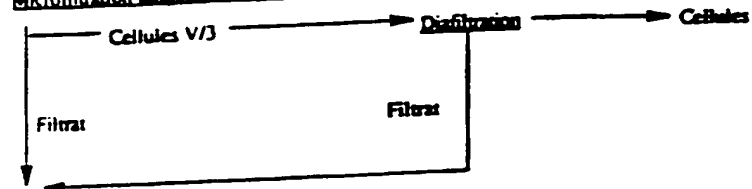
Microfiltration tangentielle 0.22 μ m**FIG.1**

EXTRACTION PROTEIQUE ES-EP**Extraction**

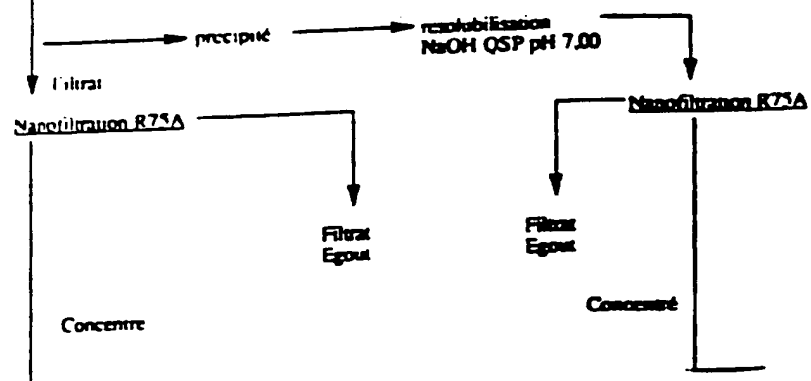
Eau déminéralisée stérile
 Soude 1N
 Chlorella à 3 %
 Broyage 2 H à 10 000 r / min ($v_{\text{tip}} = 20,9 \text{ m/s}$) avec rotor-stator à cage

Audification

HCl 37 %
 QSP pH = 9.0

Microfiltration tangentielle 0.22 μm **Précipitation**

NaCl 20 %
 HCl 17 %
 QSP pH = 2.50

Microfiltration tangentielle 0.22 μm **Disfibrillation R25 A**

Concentré protéique
 Produit final

ES

Disfibrillation R25 A

Concentré protéique
 Produit final

EP

FIG. 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	FR-A-1 125 342 (MAURIN) * le document en entier *	1,2,6-9
X	S.T.N., Serveur de bases de données, Karlsruhe, DE, Fichier Chemical Abstracts, vol 88, n 41555 * résumé *	1,2,6-9
A	& JP-A-52 125 635 (CHLORELLA SUN CO.) --- DATABASE WPI Week 8025 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 80-44039c & JP-A-55 062 005 (CHLORELLA KKK) * abrégé *	1-9
A	--- DATABASE WPI Week 7708 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 77-13720y & JP-A-52 003 835 (GEFFCY FOODS KK) * abrégé *	1-9
A	--- DATABASE WPI Week 7720 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 77-35451y & JP-A-52 044 781 (IDEMITSU KOSAN) * abrégé *	1-9
A	--- DATABASE WPI Week 7720 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 77-35088y & JP-A-52 042 483 (IDEMITSU KOSAN) * abrégé *	1-9
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL.6)
		A61K
2		
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
2 Octobre 1995		Fischer, J.P.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un ou de plusieurs revendications ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p>		

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2728467
N° d'enregistrement
national

FA 508167
FR 9415680

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	<p>DATABASE WPI Week 9421 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 94-175129 & SU-A-1 803 098 (AEROZOL SCI PRODN ASSOC) * abrégé *</p> <p>---</p>	1-9
A	<p>DATABASE WPI Week 8742 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 87-298011 & SU-A-1 299 584 (MOSC COSMETOLOGY) * abrégé *</p> <p>---</p>	1-9
A	<p>DATABASE WPI Week 8534 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 85-208921 & SU-A-1 138 161 (MOSC COSMETOLOGY) * abrégé *</p> <p>---</p>	1-9
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 14 no. 254 (C-724) [4197] & JP-A-02 072108 (YOSHIO TANAKA) * abrégé *</p> <p>-----</p>	1-9
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
<p>2</p> <p>Date d'achèvement de la recherche</p> <p>2 Octobre 1995</p>		<p>Examinateur</p> <p>Fischer, J.P.</p>
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document interchangeable</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 150 (3.82) (P4/C3)